

PCTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/867, 5/10, A01K 67/027, A61K 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/36130 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juni 2000 (22.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/04052 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Dezember 1999 (17.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 58 441.5 17. Dezember 1998 (17.12.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FLÜGEL, Rolf-M. [DE/DE]; Hermann-Brunn-Strasse 43, D-69198 Schriesheim (DE). LÖCHELT, Martin [DE/DE]; Hermann-Löns-Weg 83, D-69207 Sandhausen (DE). FLOWER, Robert [AU/AU]; Royal North Shore Hospital, Gore Hill, NSW 2065 (AU). WINKLER, Ingrid [AU/AU]; 167 Stephen Terrace, Walkerville, S.A. 5081 (AU). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: FOAMY VIRUS VECTORS FOR EXPRESSING FOREIGN GENES IN MAMMALS AND THE USE THEREOF		
(54) Bezeichnung: FOAMY-VIRUS-VEKTOREN ZUR EXPRESSION VON FREMDGENEN IN SÄUGERN UND DEREN VERWEN- DUNG		
(57) Abstract		
<p>The invention relates to retroviral vectors based on feline foamy viruses (FeFV) for introducing a desired expressible DNA into a mammal cell. An example of the inventive vector is a vector which permits the expression of neutralizing epitopes of the feline immunodeficiency virus (FIV) in cats or of the human immunodeficiency virus (HIV) in humans and thus enables an effective vaccination.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Beschrieben werden retrovirale, auf feline Foamyviren (FeFV) basierende Vektoren zur Einführung einer gewünschten, exprimierbaren DNA in eine Säugerzelle. Ein Beispiel des erfindungsgemäßen Vektors ist ein Vektor, der die Expression von neutralisierenden Epitopen des feline Immundefizienzvirus (FIV) in der Katze oder des menschlichen Immundefizienzvirus (HIV) im Menschen und damit eine wirksame Vakzinierung erlaubt.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

FOAMY-VIRUS-VEKTOREN ZUR EXPRESSION VON FREMDGENEN IN SÄUGERN UND DEREN VERWENDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft retrovirale, auf Foamy
5 Virus (FV)/Spumavirus basierende Vektoren zur Einführung einer
gewünschten, exprimierbaren DNA in Säugerzellen und
Säugetiere, wobei der retrovirale Vektor folgende Sequenzen
umfaßt: Eine erste DNA-Sequenz, die dem reversen Transkript
eines Teils eines feline FV (FeFV) entspricht, und eine
10 zweite DNA-Sequenz, die die Propagation in Bakterien erlaubt.
Die vorliegende Erfindung betrifft auch diese Vektoren
enthaltende Arzneimittel.

Retroviren sind RNA-Viren, bei denen die viralen Gene von
15 einem einzelsträngigen RNA-Molekül codiert werden. Nach
Eintritt in die Wirtszelle wird die virale RNA über reverse
Transkription in ein doppelsträngiges DNA-Molekül umgewandelt,
im Anschluß daran gelangt diese DNA in den Nucleus und
integriert sich in das Wirtsgenom als sogenanntes Provirus,
20 das wiederum die Matrize für die Expression viraler Gene und
die Synthese von Virion-RNA ist. Die viralen Genprodukte und
die Virion-RNA lagern sich zu einem intakten Virion zusammen,
das dann die Zelle wieder verlassen und neue Zellen infizieren
kann. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, daß es
25 mittels Retroviren möglich ist, Fremd-DNA in einen gewünschten
Organismus einzuschleusen und dort auch zur Expression zu
bringen. Somit bieten sich Retroviren grundsätzlich als
Vehikel für eine Gentherapie an. Allerdings waren die damit
bisher erzielten Erfolge noch nicht zufriedenstellend, da in
30 der Regel die bei der Behandlung von Tieren bzw. Menschen
verwendeten retroviralen Vektoren nur eine geringe Effizienz
aufweisen. Besonders die qualitativ ungenügende und zeitlich
limitierte Expression des therapeutischen Gens stellen
wesentliche Limitierungen der derzeitigen retroviralen
35 Vektoren dar (Anderson 1998, Nature 392, 25).

Somit liegt der Erfindung im wesentlichen das technische Problem zugrunde, einen viralen Vektor bereitzustellen, mit dem effizient heterologe Gene in einen gewünschten Säuger, beispielsweise Katze oder Mensch, eingeführt und effizient
5 exprimiert werden können.

Die Lösung dieses technischen Problems wurde durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

10

Es konnte gezeigt werden, daß mittels eines auf einem feline Foamyvirus (FeFV) basierenden Vektors gewünschte heterologe Gene effizient in einen gewünschten Säuger eingeführt werden können und dort auch exprimiert werden. Die Vorteile eines auf
15 dem feline FV basierenden Vektors beruhen vermutlich auf dessen Replikationsmechanismus, der sich von dem anderer Retroviren unterscheidet. Beispielsweise weisen FeFV einen internen Promotor zur Expression der regulatorischen "bel"-Gene auf, die für die Replikation des Virus erforderlich sind. Die Expression der "Pol"-Proteine erfolgt zudem über eine
20 gespleißte RNA und nicht als Teil eines "Gag-Pol"-Fusionsproteins. Da das FeFV eine produktive und lebenslang persistierende Infektion der Katze mit permanenter Antigenexpression induziert, verfügt das FeFV intrinsisch über
25 Mechanismen, die oben genannten Mängel bekannter Vektoren zu überkommen. Weiterhin sind Spumaviren physikalisch relativ stabil (minimale Titerreduktion bei Lagerung bei 4°C), sie weisen eine geringe genetische Variation auf, haben eine hohe Insertionskapazität und gelten als apathogen; Charakteristika,
30 die die Anwendung als retrovirale Vektoren begünstigen.

Zur Herstellung eines beispielhaften Vektors wurde das gesamte Genom von feline FV (FeFV) von den Nukleotidpositionen 17 bis zum 3'LTR in den prokaryontischen Vektor pAT153 in sequen-
35 tiellen Schritten zwischen die EagI-(5'LTR) und die ClaI-(3'LTR) Restriktionsschnittstellen eingefügt. Am 5'-Ende des viralen DNA-Inserts befinden sich dabei verschiedene eingefügte Restriktionsschnittstellen. Diese rekombinante DNA

ist z.B. in E. coli K12 genetisch stabil. Die biologische Aktivität der rekombinanten FeFV-DNA (Expression infektiöser Virionen) wurde nach Transfektion in permissive Zellen (CRFK) überprüft und es zeigte sich, daß infektiöse Virionen gebildet wurden. Diese unterschieden sich in ihrer Genexpression nicht von dem Ausgangsisolat (nicht-kloniertes FeFV). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß bei Verwendung dieses viralen Vektors, bei dem DNA-Sequenzen, die für Neutralisations-relevante Epitope des Env-Oberflächenproteins eines serologisch distinkten, genetisch verschiedenen FeFV-Isolats insertiert wurden, diese heterologen Domänen in transfizierten Zellen in funktionell aktiver Weise exprimiert wurden.

Somit betrifft eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung einen retroviralen Vektor zur Einführung einer gewünschten, exprimierbaren DNA in eine Säugerzelle, wobei der retrovirale Vektor folgende Sequenzen umfaßt: Eine erste DNA-Sequenz, die dem reversen Transkript mindestens eines Teils eines feline FV-Genoms entspricht, und eine zweite DNA-Sequenz, die die Propagation in Bakterien und somit die effiziente und gerichtete genetische Modifikation erlaubt.

Ein weiterer Bestandteil des Vektors ist ggf. eine gewünschte, exprimierbare Fremd-DNA/therapeutisches Gen.

Der hier verwendete Ausdruck "...reverses Transkript mindestens einem Teil eines FV-Genoms entsprechend" betrifft jede FV-DNA, die noch in der Lage ist, alle Funktionen des FV-Vektors, die für die Insertion der Fremd-DNA und deren Expression nötig sind, zu gewährleisten.

Der hier verwendete Ausdruck "Sequenz, die die Propagation in Bakterien erlaubt", betrifft Sequenzen, die einen "ori" für die Replikation in Bakterien, ein Markergen und/oder Resistenzgen enthalten. Beispielsweise kann eine solche Sequenz aus pAT153 (Twiggs und Sherrat, 1980, Nature 283, S. 216) stammen.

Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß zwei Arten von genetischer Modifikation bzw. Vektortypen vorteilhaft sind:

- 1) selbst-replizierende, replikationskompetente Vektoren, bei denen die Insertion heterologer Gene die Replikationsfähigkeit nicht beeinträchtigen und die im therapeutischen Wirt replizieren können. Bei den selbst-replizierenden Vektoren ist keine Packaging-Zelllinie oder ein Helfervirus notwendig;
- 2) replikationsdefekte Vektoren, bei denen z.B. die gesamten Strukturgene (gag, env, pol) durch die Fremd-DNA ersetzt wurden. Die Virionenbildung erfolgt in sog. Packaging-Zelllinien, die alle deletierten Funktionen in trans zur Verfügung stellen (gag, env, pol). In diesen Vektoren sind die für die Verpackung der Genome und Expression der Fremd-DNA notwendigen cis-Sequenzen erhalten.

Spumaretroviren/Foamyviren gelten allgemein als apathogen, obschon sie unter bestimmten experimentellen (artifiziiellen) Bedingungen (transgene Mäuse) Krankheiten auslösen können. Die "apparente Apathogenität" von Foamyviren ist einer ihrer großen Vorteile als retroviraler Vektor. Bei allen selbst-replizierenden FeFV-Vektoren sollte jedoch bevorzugt der starke Bel 1-Transaktivator zumindest funktionell inaktiviert, vorzugsweise aber komplett deletiert sein.

Die in die erfindungsgemäßen Vektoren einbringbare Fremd-DNA unterliegt keiner Beschränkung und es sind prinzipiell alle Krankheits-relevanten Gene möglich. Beispiele für Fremd-DNA (auch heterologe Gene oder therapeutische Gene genannt) sind

- Immunmodulatorische Gene zur Aktivierung oder Suppression von Immunreaktionen im Zuge von Anti-Krebstherapien, z.B. Interleukin-2, -1, -10 etc., gamma-Interferon, Tumor Nekrosis Faktor, spezielle Tumorantigene
- Suizidgene zur spezifischen Destruktion der entsprechend infizierten Zellen, z.B. HSV Thymidin-Kinase, E. coli Cytosin Deaminase, Polynukleosid-Phosphorylase

- funktionell intakte Gene zur Substitution funktionell defekter Gene im Zuge der somatischen Gentherapie,
- Expression von trans-dominant negativen Mutanten-Proteinen, die inhibitorisch im Rahmen der "pathogen derived resistance" oder "intrazellulären Immunisierung" eingesetzt werden,
- Gene, deren Proteinprodukt aus transgenen Tieren in geeigneter Form in technisch/industriellem Maßstab insoliert und gereinigt werden kann, z.B. Faktor X der Blutgerinnung oder dgl.

Erfindungsgemäß handelt es sich bei dem retroviralen FV-Vektor um einen Vektor bei dem das Genom des felines Foamyvirus (FeFV) verwendet wurde. Dabei kann es sich um einen Vektor handeln, bei dem die erste DNA-Sequenz die FV-DNA-Sequenz des Vektors FeFV-7 ist. Dieser Vektor wurde als Plasmid pFeFV-7 bei der DSMZ, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig am 23. November 1998 unter DSM 12514 hinterlegt.

Die erste DNA-Sequenz des Vektors kann sich jedoch von der DNA-Sequenz des Vektors pFeFV-7 unterscheiden und lediglich von ihr abgeleitet sein. Der FeFV-Anteil des Plasmids kann beispielsweise in der Weise modifiziert sein, daß er entsprechend den Anforderungen des Vektorkonzepts (selbst-replizierender oder replikationsdefekter Vektor) genetisch verändert wird und die Fremd-DNA (oben auch als heterologes Gen bzw. therapeutisches Gen bezeichnet) unter der transkriptionellen Kontrolle des FeFV oder eines heterologen Promotors insertiert wird. Beispielsweise kann sich die erste DNA-Sequenz auch von der des erfindungsgemäßen Vektors pFeFV-7 bezüglich der Länge unterscheiden, oder verschiedene Nukleotidadditionen, -deletionen oder substitutionen aufweisen, beispielsweise von einem anderen Feldisolat von FeFV stammen, solange die gewünschten Eigenschaften des Virus, beispielsweise hinsichtlich Infektiosität, Replikation, Insertion und Expression der Fremd-DNA für die gewünschten erfindungsgemäßen Zwecke erhalten bleiben. Der Fachmann kann

mittels üblicher Methoden, beispielsweise den in den nachfolgenden Beispielen oder in Winkler et al., J.Virol. 71 (1997), 6727-6741, angegebenen Verfahren bestimmen, ob die für die Herstellung des retroviralen FeFV-Vektors verwendete DNA-Sequenz noch die erforderlichen Bedingungen erfüllt. Darüber hinaus können allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren zur Konstruktion der erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise übliche in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren.

Die gewünschte, zu exprimierende Fremd-DNA kann an jeder Stelle des FV-Genoms inseriert werden, vorausgesetzt, daß dadurch deren Expression gewährleistet ist, sowie die gewünschten Eigenschaften des FV (beispielsweise selbst-replizierender oder replikationsdefekter Vektor) erhalten bleiben. Prinzipiell kann die Fremd-DNA an jeder Stelle des FeFV-Genoms inseriert werden. Es sollte allerdings so sein, daß der FeFV-Anteil immer noch in dem oben angesprochenen Sinne (selbst-replizierender/replikations-defekter Vektor) aktiv ist. Vorzugsweise wird die Fremd-DNA-Sequenz zwischen den 5'LTR-Bereich und den 3'LTR-Bereich inseriert. Bei selbst-replizierenden Vektoren können heterologe Sequenzen in die Gag, Env und Bel2-Gene bzw. in definierte Teile der 3'-LTR eingefügt werden, bei replikations-defekten Vektoren werden bevorzugt die Gag, Pol, Env und akzessorischen/regulatorischen Gene durch die zu exprimierende Fremd-DNA ersetzt. Um eine effiziente Expression der Fremd-DNA-Sequenz zu erhalten, ist es erforderlich, diese so in den FV-Vektor zu inserieren, daß sie mit geeigneten transkriptionellen Kontrollsequenzen funktionell verknüpft vorliegt. Geeignete, für die Expression in Säugern geeignete Kontrollsequenzen (d.h. Promotor- und/oder Enhancer-Sequenzen) sind dem Fachmann bekannt. Als Promotoren sind die dem Fachmann bekannten Promotoren verwendbar. Diese umfassen beispielsweise

- den genetisch modifizierten FeFV LTR-Promotor oder den internen Promotor
- konstitutiv aktive Promotoren, z.B. HSV-tk, CMV-IE

- zelluläre housekeeping Promotoren, z.B. beta-Actin, GADPH
- zelltyp-spezifische Promotoren für die Expression in haematopoetischen Zellen, dem ZNS, der Leber, Niere etc.
- induzierbare Promotoren, z.B. Insulin-, Corticoid-, Stress-, Östrogen-abhängige Promotoren
- virus-aktivierbare Promotoren, z.B. HIV LTR für intrazelluläre Immunisierungen
- Promotoren, die durch etablierte Therapeutika aktiviert werden (Tamoxifen etc.)

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält der retrovirale FV-Vektor außerdem ein Gen, das einen nachweisbaren phänotypischen Marker codiert. Dies erlaubt die Überprüfung einer erfolgreich verlaufenen Transformation der gewünschten Zielzelle. Geeignete Markergene sind beispielsweise:

- β -Galactosidase
- Resistenzgene gegen Neomycin, Hygromycin, Zeonin etc.
- (humanisiertes) green fluorescent Protein GFP

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Plasmid, das den erfindungsgemäßen FeFV-Vektor enthält. Das Plasmid kann beispielsweise in E. coli, z.B. E. coli JM 109 oder DH5 α , vermehrt werden und aus diesen direkt isoliert werden.

Verfahren zur Transformation der Zellen zur Herstellung des erfindungsgemäßen FV-Vektors (beispielsweise über CaPO₄-Präzipitation, Liposomen oder Elektrotransformation etc.) und zur phänotypischen Selektion von Transformanten sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Nach erfolgter Vermehrung können die erfindungsgemäßen FV-Vektoren in eine Zelle, ein Gewebe, Organ, einen Patienten oder ein Tier durch eine Reihe von Verfahren eingeführt werden. Das FeFV (und somit auch das davon abgeleitete Plasmid

pFeFV-7) kann in Zellen humanen Ursprungs replizieren. Das das FeFV diese humanen Zellen auch infizieren kann, sind keine absolut essentiellen Veränderungen des Plasmids pFeFV und seiner Derivate für die Replikation und Applikation in humanen Zellen und den Menschen notwendig. Für die ex-vivo Applikation kommen die vorgenannten Verfahren sowie Co-Kultivierung mit Vektor-produzierenden Zellen und direkte Infektion mit dem retroviralen Vektor in Frage. Für die in-vivo Applikation kommen in Frage: als DNA durch die Gen-Gun; Liposomen-Technik; als freies Retrovirus systemisch (z.B. intravenös), lokal (z.B. direkt in einen Tumor oder das lymphatische Organ) oder in Form eines Aerosols für den Respirationstrakt. Es können analog auch die Vektor-produzierenden Zellen verabreicht werden.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch Zellen und transgene Tiere (d.h. Säuger, die bezüglich der mittels des erfindungsgemäßen FV-Vektors eingeschleusten DNA-Sequenz transgen sind). Verfahren zur Herstellung solcher transgener Tiere können beispielsweise in WO 91/08216 oder Schenkel, Johannes, 1995, Transgene Tiere, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg gefunden werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Arzneimittel, die die vorstehend beschriebenen FV-Vektoren enthalten. Diese Arzneimittel enthalten gegebenenfalls zusätzlich einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Die Art des Trägers hängt natürlich davon ab, wie der erfindungsgemäße FV-Vektor verabreicht werden soll. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Tiers bzw. Patienten, dem Schweregrad der Erkrankung, der Art der Verabreichung etc..

Der erfindungsgemäße FV-Vektor kann beispielsweise auch für die Expression von DNA-Sequenzen, die für neutralisierende Epitope pathogener Erreger codieren, verwendet werden, d.h. er kann für eine Vakzinierung gegenüber diesen Erregern verwendet werden. Dies ist vor allem hinsichtlich solchen infektiösen Erkrankungen, beispielsweise bei Katzen, interessant, für die bisher keine geeigneten Impfstoffe zur Verfügung standen. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, daß es sich bei den exprimierten Epitopen um therapeutische (immunologisch) wirksame Domänen handelt und die Vakzinierung nicht z.B. zu einer Immunpathogenese bei nachfolgender Virus-Challenge führt. Beispielsweise kann die Fremd-DNA-Sequenz für neutralisierende Epitope des feline Immundefizienzvirus (FIV) codieren. Dabei wird ein FV-Vektor erhalten, der die effiziente Vakzinierung von Katzen gegenüber FIV erlaubt. Andere geeignete Fremd-DNA sind virale Env-Oberflächendomänen oder T-Zellepitope von viralen Struktur- oder Nichtstrukturproteinen. Wie bereits oben ausgeführt ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Gegenstände aber keineswegs auf die Vakzinierung beschränkt, sondern stellt allgemein ein Vehikel für die Gentherapie dar.

Um die Praktikabilität von FeFV-basierten Vektoren zu demonstrieren, wurden die für die Virus-Neutralisation relevanten Epitope des von den Erfindern verwendeten Isolats FUV durch die entsprechenden Sequenzen eines Isolats 951-ähnlichen FeFV-Virus (Flower et al., 1985, Arch. Virol. 83, S. 53) ausgetauscht. Das genetisch modifizierte Virus ist replikationskompetent und wird aufgrund des Austausches von Neutralisations-relevanten Epitopen nicht mehr durch Seren gegen das FeFV-FUV-Isolat neutralisiert werden. Dieses genetisch modifizierte, nun 951-ähnliche FeFV kann eventuell aufgrund seiner distinkten immunologischen Charakteristika in Katzen (oder Menschen) dann als gentherapeutischer Vektor eingesetzt werden, wenn bereits eine humorale Immunität gegen den ursprünglichen, FUV-ähnlichen Vektor, vorliegt. Eine solche Situation kann vorliegen, wenn der therapeutische Einsatz des Vektors wiederholt durchgeführt werden muß. Somit

kann die Verfügbarkeit der immunologisch distinkten FeFV-Vektoren einen wesentlich flexibleren Einsatz dieser rekombinanten Viren in der Therapie erlauben. Therapeutische Applikationen sind trotz bestehender Immunität gegen ein FeFV-Virus-Isolat immer noch mit dem anderen FeFV-Serotyp möglich, was ein Vorteil ist, den keines der anderen retroviralen Vektorsysteme aufweist.

Der erfindungsgemäße FV-Vektor ist jedoch nicht nur für die Gentherapie/Vakzinierung von Tieren, beispielsweise Katzen geeignet, sondern auch für entsprechende Therapien beim Menschen. Aufgrund der Tatsache, daß (a) mit dem vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen FeFV-Vektor Katzen gegen FIV geimpft werden können und (b) die FIV-Infektion der Katze molekularbiologisch und pathogenetisch sehr stark der HIV-Infektion des Menschen ähnelt (siehe beispielsweise dazu Elder et al., Aids Research and Human Retroviruses 14 (1998), 797-801), kann davon ausgegangen werden, daß der erfindungsgemäße FV-Vektor nicht nur zur Gentherapie beim Menschen hinsichtlich beispielsweise der Einführung von Tumorsuppressorgenen geeignet ist, sondern auch zur Durchführung einer Schutzimpfung gegenüber HIV von Nutzen ist. Für die Vakzinierung gegen die HIV-Infektion bieten sich primär T-Zell Epitope und Sequenzen der HIV Struktur- und Nichtstrukturproteine an, die einerseits immunrelevante Epitope tragen und gleichzeitig zumindest moderat konserviert sind. Von den Erfindern wurde bestätigt, daß feline und humane Zellen den erfindungsgemäßen Vektor replizieren, und rekombinante Vektorpartikel werden in beiden Zelltypen (z.B. feline CRFK-Zellen, humane 293T-Zellen) gebildet.

Schließlich betrifft somit die vorliegende Erfindung auch die Verwendung des erfindungsgemäßen FV-Vektors zur Vakzinierung, vorzugsweise gegenüber FIV bei Katzen oder HIV beim Menschen.

Die Figuren zeigen:

Fig 1: Schematische Darstellung der Organisation des FeFV-

Provirus

Fig.2: Nucleinsäure-Sequenz und abgeleitete
Aminosäuresequenz von FeFV (Winkler et al., J. of
Virology, Vol. 71, No. 9, Sept. 1997, S. 6727-6741)

Fig.3: Karte des Clons pFeFV-7 (Länge: 14.463 bp)
Die pAT153 und die FeFV entsprechenden Anteile sind
gekennzeichnet. Außerdem sind die Positionen der
wichtigsten Restriktionsschnittstellen angegeben.

Die nachstehenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung.

Beispiel 1**Herstellung eines FeFV-Vektors (pFeFV-7)**

Die Gewinnung von FeFV-Isolaten, die DNA-Extraktion, die
Konstruktion von rekombinanten FeFV-DNA-Clonen und die Analyse
dieser Clone erfolgte im Prinzip wie in Winkler et al.,
J.Virol. 71 (1997), 6727-6741, beschrieben. FeFV-DNA-Sequenzen
von den Nucleotidpositionen 5118 bis 7431 wurden durch "long-
template PCR" unter Verwendung spezifischer Primer und der DNA
von mit FeFV infizierten "Crandell"-Katzennierenzellen (CRFK-
Zellen) durchgeführt. Die Primer sind:

5118: 5'-CCTCATGCTTACGGGAATAATCTGGCTG-3' (forward)

7431: 5'-GAATAGCATAACCAGAGCCTACAGGGCTC-3' (reverse)

7163: 5'-CCAATTGGACAAGAGTAGAATCCTATGG-3' (forward)

9057: 5'-TTCTCCAAGGAGCTGCAGCCACTCTGG-3' (reverse)

5775: 5'-TTTGCTCAGTGGGCAAAGGAAAGGAATATACAATTGG-3'
(forward)

10522: 5'-GTTGACACTGATTTATATGGCACAATAATTCCTCTC-3'
(reverse)

Die erhaltene amplifizierte DNA wurde in pCRII-Vektoren (Fa.
Invitrogen, Niederlande) mittels üblicher Verfahren cloniert.
Korrekte recombinante DNA-Clone wurden mit NdeI (in FeFV) und
Ecl136II (im pCRII-Vektor) geschnitten und das erhaltene

Fragment von etwa 2,3 kbp wurde in den FeFV-DNA-Clone 7 (der mit ClaI gespalten, danach mittels Klenow-Polymerase mit glatten Enden versehen und schließlich mit NdeI geschnitten worden war) inseriert. Clone 7 enthält FeFV-DNA-Sequenzen von den Nucleotidpositionen 17 bis 5811 (Winkler et al., 1997). Durch diese Clonierung wurden FeFV-Clone erhalten, die sich von der Nucleotidposition 17 bis 7431 erstreckten (Clone 24 und 28).

Gleichzeitig wurde die FeFV-Insertion aus den rekombinanten Clonen 4, 6 und 8, die FeFV-DNA-Sequenzen von den Nucleotidpositionen 8636 bis zum 3'-Ende des 3'LTR enthielten (Winkler et al., 1977), in den Vektor pBluescript KS (Fa. Stratagene, Heidelberg) subcloniert, wobei die gemeinsamen flankierenden Restriktionsenzymchnittstellen des Polylinkers verwendet wurden. In den erhaltenen Clonen 5, 7 und 15 schließen sich an das 3'Ende des Genoms ClaI- und ApaI-Schnittstellen von den PCR-Primern und der Polylinkerstelle des Vektors an. FeFV-DNA-Sequenzen von den Nucleotidpositionen 7163 bis 9057 wurden durch "long-template PCR" unter Verwendung der oben genannten Primer amplifiziert und in das Plasmid pCRII wie vorstehend beschrieben cloniert, wobei der Clone V erhalten wurde.

Zur Herstellung eines Clons, der die vollständige provirale DNA enthält, wurden die folgenden clonierten, vorstehend beschriebenen DNA-Fragmente in einer Dreifachligation miteinander verknüpft: Das ApaI(Vektorschnittstelle)/Pml I-Fragment der Clone 24/28 + das PmlI/PstI-Fragment der Clone V + das PstI/ApaI-Fragment der Clone 5, 7 und 15.

Die erhaltenen DNA-Clone waren genetisch stabil und enthielten FeFV-DNA von den Nucleotidpositionen 17 bis 11700 als Insertion im pBluescript-Vektor. Die FeFV-Insertion zwischen den EagI- und ClaI-Stellen, die die FeFV-DNA flankieren, wurden dann in den entsprechend geschnittenen Vektor pAT153 (= "high copy-number" Deletionsmutante von pBR322; Twiggs und Sherrat, 1980, Nature 283, S. 216) subcloniert.

Verschiedene, unabhängig erhaltene Clone wurden nach Transfektion in FeFV-permissive eukaryontische CRFK-Zellen analysiert; es zeigte sich jedoch eine geringe Infektiosität. Clone 13 zeigte eine moderate virale Infektiosität und wurde daher zur vollständigen Restaurierung der Infektiosität verwendet. FeFV-DNA-Sequenzen von den Nucleotidpositionen 5775 bis 10522 wurde mittels "long-template PCR" unter Verwendung der oben genannten Primer amplifiziert und direkt mit BstZ17I (Nucleotidposition 5980) und BsaI (Nucleotidposition 10137) geschnitten. Das erhaltene DNA-Fragment mit einer Länge von etwa 4,2 kbp wurde zum Austausch der entsprechenden Sequenzen des Clons 13 (mit vollständiger Länge) verwendet. Nach Transfektion in CRFK-Zellen zeigte sich, daß der erhaltene FeFV-Clone pFeFV-7 voll infektiös und genetisch stabil war. Das erhaltene rekombinante FeFV-Virus war von nichtclonierten, aus Zellkulturen erhaltenen Viren nicht unterscheidbar. pFeFV-7 wurde am 23. November 1998 unter der Nummer DSM 12514 bei der DSMZ, Mascheroder Weg 2, Braunschweig hinterlegt.

Beispiel 2

Herstellung einer Neutralisations-resistenten Variante von pFeFV-7, die heterologe Sequenzen des FeFV-Serotyps 951 in Katzenzellen exprimiert

Um die Praktikabilität von FeFV-basierten Vektoren zu demonstrieren, wurden die für die Virus-Neutralisation relevanten Epitope des oben beschriebenen FeFV-7 Isolats durch die entsprechenden Sequenzen eines Isolats 951-ähnlichen FeFV-Virus (Flower et al., 1985, Arch. Virol. 83, 53) ausgetauscht. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Die Env DNA-Sequenzen des FeFV-Isolats 951 wurden aus DNA von FeFV-951-infizierten CRFK-Zellen mit dem forward-Primer 5'-GACATACCTGAAGATATTC-3' (Position 6418) und dem reverse-Primer 5'-CGACTTGTACCAGGCCTATTCCTGG-3' (Position 9901) mittels PCR amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit der Restriktionsendonuklease KpnI verdaut und das ca. 3,5 kB große DNA-Fragment isoliert. Parallel wurde der oben beschriebene FeFV-Vektor pFeFV-7 mit Kpn verdaut und das dem Vektor-Backbone entsprechende DNA-Fragment isoliert. Beide DNAs wurden

miteinander ligiert und die Rekombinanten identifiziert, bei denen die FeFV-951 env DNA-Sequenzen in der korrekten Orientierung in pFeFV-7 insertiert worden waren. Der resultierende DNA-Klon pFEFV-7/951 ist genetisch stabil. Nach Transfektion in CRFK-Zellen ist das Proteinexpressionsmuster dieses Klons nicht von dem Wildtyp-Klon pFeFV-7 unterscheidbar. Plasmid pFeFV-7/951 induziert die Synthese infektiöser FeFV-Partikel.

Das genetisch modifizierte Hybrid pFeFV-7/951 ist replikationskompetent und wird aufgrund des Austauschs von Neutralisations-relevanten Epitopen nicht mehr durch Seren gegen das FeFV-Isolat neutralisiert. Dies wurde in Neutralisationsstudien gezeigt: Seren, die gegen das FEFV-Isolat gerichtet sind, neutralisieren Nachkommen des Plasmids pFeFV-7, nicht aber Viren des Klons pFEFV-7/951. Seren gegen das FeFV-Isolat 951 neutralisieren entsprechend Viren des Klons pFeFV-7/951, nicht jedoch vom Plasmid pFeFV-7.

Es wurde in diesem Beispiel somit ein chimärer Hybridvektor konstruiert, der heterologe Protein-Sequenzen effizient und stabil exprimiert. Zudem wurde erstmals ein Vektorpaar (Plasmids pFeFV-7 und pFeFV-7/951) konstruiert, das keine kreuzneutralisierenden Antikörper induziert.

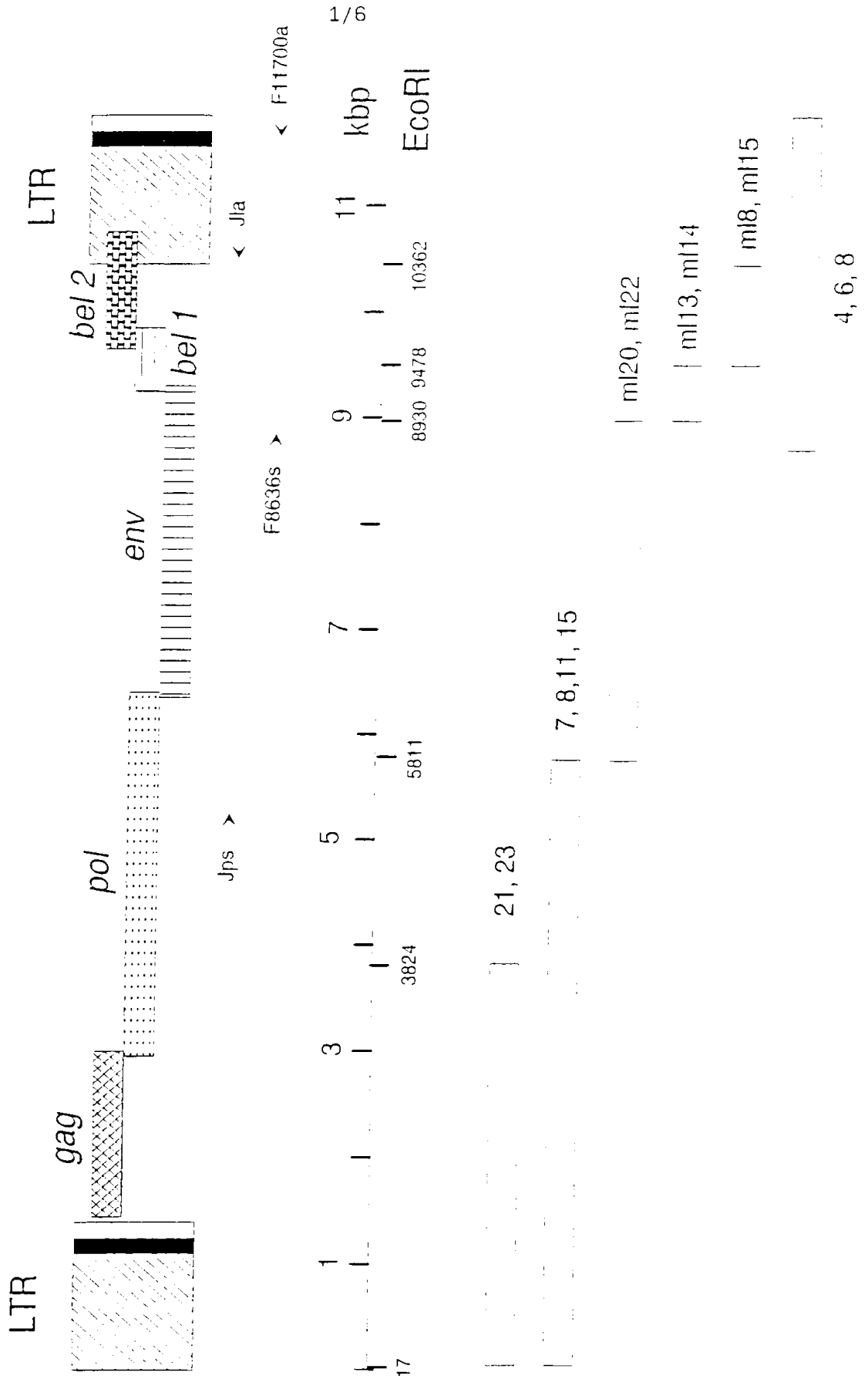
In einer therapeutischen Anwendung beider Vektoren kann also zuerst ein Serotyp (z.B. FeFV-7) für den Transfer des therapeutischen Gens eingesetzt werden. Etabliert der Patient eine neutralisierende Seroreaktivität gegen diesen Vektor-Serotyp, kann der andere Serotyp (in diesem Fall pFeFV-7/951) eingesetzt werden, gegen den keine neutralisierenden Antikörper vorliegen. Therapeutische Applikationen wären trotz bestehender Immunität gegen ein Virus-Isolat immer noch mit dem anderen Serotyp möglich. Dies ist ein Vorteil, den kein anderes retrovirales Vektorsystem aufweist.

Patentansprüche

1. Retroviraler Vektor zur Einführung einer gewünschten,
5 exprimierbaren DNA in eine Säugerzelle, wobei der
retrovirale Vektor folgende Sequenzen umfaßt: Eine erste
DNA-Sequenz, die dem reversen Transkript mindestens eines
Teils eines felineen Foamyvirus (FeFV) entspricht, und
10 eine zweite DNA-Sequenz, die die Propagation in Bakterien
erlaubt.
2. Retroviraler Vektor nach Anspruch 1, wobei in dem Vektor
weiter eine gewünschte exprimierbare Fremd-DNA enthalten
15 ist
3. Retroviraler Vektor nach Anspruch 1 oder 2, wobei die
erste DNA-Sequenz das reverse Transkript des gesamten
Foamyvirus umfaßt.
- 20 4. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
wobei die erste DNA-Sequenz sowohl die 5'LTR als auch die
3'LTR eines Foamyvirus umfaßt.
- 25 5. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
wobei die zweite DNA-Sequenz in den 5'LTR-Bereich
und/oder 3'LTR-Bereich des Foamyvirus inseriert ist.
6. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5, der
30 zusätzlich ein Gen enthält, das einen nachweisbaren
phänotypischen Marker codiert.
7. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
wobei die zweite DNA-Sequenz für neutralisierende Epitope
35 des felineen Immundefizienzvirus (FIV) oder des
menschlichen Immundefizienzvirus (HIV) codiert.
8. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
wobei die erste DNA-Sequenz jene des bei der DSMZ am 23.

November 1998 hinterlegten Plasmids pFeFV-7 (DSM 12514) ist.

- 5 9. Plasmid, den retroviralen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8 enthaltend.
- 10 10. Zelle, das Plasmid nach Anspruch 9 enthaltend.
11. Zelle nach Anspruch 10, die eine Tierzelle ist.
12. Zelle nach Anspruch 11, die eine Säugerzelle ist.
- 15 13. Transgenes Tier, den retroviralen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder das Plasmid nach Anspruch 9 enthaltend.
- 20 14. Verwendung des Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder des Plasmids nach Anspruch 9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vakzinierung.
15. Verwendung des Vektors nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vakzinierung von Katzen gegen FIV oder Menschen gegen HIV.
- 25 16. Verwendung des Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder des Plasmids nach Anspruch 9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur gentherapeutischen Behandlung von Patienten.





PBS
1356 TGGCGCCCAACGCTGGGCTCGATTGAGTGAAATTTAAATTAAGCTGAGGAGAATAATCCCTAGGGACCTTACCTTACTGAGGAAGGATGGCTCGAGAATT
Gag M A R E L

1456 AAATCCTCTCCAATTACAGCAACTGTATATAAATAATGGCTTACAACCTAATCCAGGACATGGAGATATTATTGCTGTGAGATTTACAGGAGGACCTTGG
N P L Q L Q Q L Y I N N G L Q P N P G H G D I I A V R F T G G P W

1556 GGTCCAGGTGATAGATGGGCTAGAGTGACAATACGATTACAAGATAACACAGGACAACCTTTACAGGTTCTCGGATATGATTGGAACTGGGATAATAA
G P G D R W A R V T I R L Q D N T G Q P L Q V P G Y D L E P G I I N

1656 ATTTGAGAGAGSATATCTTGATAGCAGGGCCATATAATTTAATAAGAACTGCCTTTTGGACTTAGAGCCTGCCAGAGGACCTGAAAGGCATGGTCCCTT
L R E D I L I A G P Y N L I R T A F L D L E P A R G P E R H G P F

1756 TGGAGATGGCAGATTACAGCCTGGAGATGGTTTATCTGAAGGATTTCAACCTATCACTGATGAAGAAATACAAGCAGAAGTAGGAAGCTATTGGTGGTGGT
G D G R L Q P G D G L S E G F Q P I T D E E I Q A E V G T I G A A

1856 AGAAATGAGATAAGATTATTACGAGAAGCTTTACAGAGATTACAAGCTGGAGGTGTGGGTAGACCTATACCAGGAGCAGTTTACAACCACAAACAGTAA
R N E I R L L R E A L Q R L Q A G G V G R P I P G A V L Q P Q P V I

1956 TAGGGCCGGTAATACCAATTAATCATCTTAGGTGGGTTATGGCAATCTCCACCAATCCACGAGATGTCCGCCATATGGCTTGGAAAGATCTACAGCCGC
G P V I P I N H L R S V I G N T G C P N P R D V A L E P G R S T A A

2056 TATTGAGGAGTATTTCCCATAGTGGACCAAGTCACTCTATGAGGGTAGTTAATGCCCTTAGTAGCATCTCATCCCGCCTAACGTTGACTGAGAATGAG
I E G V F P I V D Q V T R M R V V N A L V A S H P G L T L T E N E

2156 GCCGGGAGCTGGAATGCTGCCATATCAGCTTTATGGAGGAAAGCTCAGGGTGTGCGAGCTCAGCATGAATTGGCAGGAGTATTAAGTGATATAATAAAA
A G S W N A A I S A L W R K A H G A A A Q H E L A G V L S D I N K K

2256 AGGAAGGCATACAACTGCATTCAACCTAGGAATGCAATTTACAGATGGAACTGGTCTCTAGTATGGGAATAATCAGGACTCTTTTACCAGGACAAGC
E G I Q T A F N L G M Q F T D G N W S L V W G I I R T L L P G Q A

2356 CCTAGTAACCAATGCTCAGTCACAATTTGACCTAATGGGAGATGATATACAACGAGCAGAAAAATTTCCCGAGGGTCATTAACAATCTATACACTATGCTG
L V T N A Q S Q F D L M G D D I Q R A E N F P R V I N N L Y T M L

2456 GGTCTCAATATACATGGGCAAGTATTAGACCTCGGGTCCAAACACAGCCACTACAACTCGACCCCGGAACCCGGGAGCTCTCAACAAGGTCAACTAA
G L N I H G Q S I R P R V Q T Q P L O T R P R N P G R S Q G Q L N

2556 ATCAGCCGAGACCCCAAAATAGAGCTAACCAATCTTATAGACCCCTAGACAACAACAGCAACACTCTGATGTTCCCGAACAGAGAGATCAGAGAGGACC
Q P R P Q N R A N Q S Y R P P R Q Q Q Q H S D V P E Q R D Q R G P

2656 GTCGCAACCTCTCTGGAAGTGGAGGAGATATAATTTAGAAGAAATCCGAGCAGCTCAGCGCTACGGCAAGGACCACAGGACCAAAACCCGTAC
S Q P P R G S G G G Y N F R R N P Q Q P Q R Y G Q G P P G P N P Y

2756 CGAGGATTCGGAGACGGCGGTATCTCAACAGCAGGGACCCACCAACAGGAGGCTGATCAAGGACCTCGGCCAGGAGGCAATCCCAGGAGGAGGAG
R F G D G N P Q Q G G P P N R G G P D Q G P R P G N P R G G G

2856 GAAGAGGTCAAGGTCCAAGAAATGGAGGAGGAGCGCTGCCCGAGTACATACAGTAAAGCGTCTGAAAACGAAACTAAAAATGGATCTGTGAAGCGGT
R G Q G P R N G G S A A A V H T V K A S E N E T K N G S A E A V
Pol M D L L K P L

2956 TGACGGTGGAAAGAAAGGGGTAAAGATTAAAGGTTACTGGGACTCCCAAGCCGATATTACCTGTGTTCCAAAGGACTTGCTTCAAGGAGAAGAACTGT
T V E R K G V K I K G Y W D S Q A D I T C V P K D L L Q G E E P V
D G G K K G G K D *

3056 TAGGCAGCAAAATGTGACTACTATACATGGAACGCAGGAAGGAGATGTATATTATGTAATTTAAAAATAGACGGTAGAAGAATTAATACAGAAGTAATA
R Q Q N V T T I H G T Q E G D V Y Y V N L K I D G R R I N T E V I

3156 GGGACAACTTTGGACTATGCTATTATACTCTGGAGATGTACCTTGGATTTTGAAGAAACCTCTAGAATTGACTATTAACTAGATTAGAAGAGCAGC
G T T L D Y A I I T P G D V P W I L K K P L E L T I K L D L E E Q Q

3256 AAGGGACTTTTACTTAACAAATCCATTTTCTAAAAAGGGAAAGAAAGAAATTAACAAATTTATTGAGAAATATAGTGCCTTATGGCAAGTTGGGAGAA
G T L N N S I L S K K G K E E L K Q L F E K Y S A C L T W K P G S W E N

3356 TCAGGTGGGTATAGAAGAATTAGGCCACATAAAATAGCAACTGGTACAGTAAACCCACACCTCAGAAACAGTATCATATTAATCCAAAGGCCAAAACCT
Q V G H R R I R P H K I A T G T V K P T P Q K Q Y H I N P K A K P

3456 GATATTGAGATTGTGATAAATGATTACTAAAAAGGGGTACTAATTCAAAAGSAAAGTACTATGAACACTCCTGTCTACCCAGTACCCAAGCCAAATG
D I Q I V I N D L L K Q G V L I Q K E S T M N T P V Y P V P K P N G

3556 GTCGCTGGAGAATGGTACTGGACTACAGAGCAGTAAATAAGTCACACCTTTGATAGCTGTACAAAATCAACACTCGTATGGAATTTTAGGAAGTCTTTT
R W R M V L D Y R A V N K V T P L I A V Q N Q H S Y G I L G S L F

3656 TAAAGGTAGATATAAACTACAATTGATTTATCCAATGGTTTCTGGGCACACCCCATAGTCCCAGAGGATTATTGGATTACTGCATTCACCTTGGCAAGGA
K G R Y K T T I D L S N G F W A H P I V P E D Y W I T A F T W Q G

3756 AAACAATATTGTTGGACTGTTTACCACAAGGTTTTTAAACAGCCCTGGGTTGTTTACTGGAGATGTGTAGATCTTCTACAGGGAATTTCCCAACGTGG
K Q Y C W T V L P Q G F L N S P G L F T G D V V D L L Q G I P N V E

3856 AAGTCTATGTGGACGATGTATATATTAGTCATGATTCTGAAAAGAACATTTGGAATATCTGATATTTTGTTTAATAGATTAAAGAAAGCAGGATATAT
V Y V D D V Y I S H D S E K E H L E Y L D I L F N R L K E A G Y I

3956 AATATCTCTTAAAAATCCAATATTGCCAATCTATTGTGGATTTCTTGGTTTTCAGATTACTAATGAAGSCCGGGGCTGACAGATACTTTTAAAGAA
I S L K K S N I A N S I V D F L G F Q I T N E G R G L T D T F K E

4056 AAATTGGAAAAATTAATCTGCCCTTACCCTCTTAAACAATTCGAAAGCACTAGGTCTTTTAAATTTTCCAGAAATTTTATCTGACTTTTACTGAAT
K L E N I T A P T T L K Q L Q S I L G L L N F A R N F T P D F T T E L

4156 TAATTGCTCTTTATATGCAATTGATACCAAGTCTACCAAGAATTATGTTCTTGGCAATAGAACATTCAACCACTCTGGAACCTTAAATTAATAAAT
I A P L Y A L I P K S T K N Y V P W Q I E H S T T L E T L I T K L

4256 AAACGGGGCAGAATATTACAAGGAAGAAAAGGAGATAAAACATTGATCATGAAAGTCAATGCTAGTTATACAACAGGATATATAAGGTATTATAATGAA
N G A E Y L Q G R K G D K T L I M K V N A S Y T T G Y I R Y Y N E

4356 GGGGAAAAGAGCCAATATCTATGTAAGTATAGTGTTCAGCAAACTGAATTGAAATTCAGTGAAGTAGAGAAATGCTGACCACTGTGCACAAGGGTC
G E K K P I S Y V S I V F S K T E L K F T E L E K L L T T V H K G L



4456 TTTTAAAGGCCTTGGACTTGTCAATGGGGCAAAACATTTCATGTTTATTCCTCCCATTTGATCCATGCAAAATATTCAAAAAACACCACAGACTGCTAAAAA
L K A L D L S M G Q N I H V Y S P I V S M Q N I Q K T P Q T A K K

4556 GGCTTTGGCCTCTCGATGCTTGAGTTGGCTTTCTTATTTGGAAGATCCGAGAATTAGGTTCTTTATGATCCACAGATGCTGCTCTAAAAAGATTGCGCT
A L A S R W L S Y L E D P R I R F F Y D P Q M P A L K D L P

4656 GCTGTAGACACCGGAAAAAGATAATAAAAAACATCTAGCAATTTCAACATATATTTTACACTGATGGTTCTGCTATCACGTCCCCCTACTAAGGAGGGAC
A V D T G K D N K K H P S N F Q H I F Y T D G S A I T S P T K E G H

4756 ATTTAAACGCTGGAATGGGAATAGTTTATTTATAAACAAAGATGGAATTTACAAAAGCAACAGGAATGGTCCATTAGTTTGGGGAATCATACAGGACA
L N A G M G I V Y F I N K D G N L Q K Q Q E W S I S L G N H T A Q

4856 ATTTGCAGAAATAGCTGCTTTTGGCTTTGCCCTTAAAAATCTTTGCCTTTGGGAGGAAACATTCTTGTGGTTACTGACAGCAATTATGTTGCAAAAGCA
F A E I A A F E F A L K K C L P L G G N I L V V T D S N Y V A K A

4956 TATAATGAGGAATTTGATGTTTGGGCTCTAATGGCTTTGTGAATAACAGGAAGAAACCTTTGAACATATTAGTAAATGGAAATCGGTTGCTGACCTTA
Y N E E L D V W A S N G F V N N R K K P L K H I S K W K S V A D L K

5056 AAAGATTAAAGCCAGATGTTGTTGTGACCCATGAGCCAGGTACCAAAAACTTGACTCATCTCTCATGCTTACGGGAATAATCTGGCTGATCACTGGC
R L R P D V V T H E P G G H Q K L D S S P H A Y G N N L A Y Q L A

5156 CACGCAAGCCAGTTTAAAGTACATATGACTAAAAATCCCAAGCTGGACATTGAGCAAAATAAGGCAATTCAAGCATGTCAAAATAATGAAGATTACCT
T Q A S F K V H M T K N P K L D I E Q I K A I Q A C Q N N E R L P

5256 GTTGGTTATCCAAAACAATATACCTATGAGTTGCAAAATAATAATGTATGGTTTTAAGAAAAGACGGTTGGAGGGAATTCCTCCTTCCCAAGAACGGT
V G Y P K Q Y T Y E L Q N N K C M V L R K D G W R E I P P S R E R Y

5356 ATAACTTATTAAGAAGCACATAACATTAGTCATGACGCGCGAGAAGCGGTATTATTAATAATACAGAAAATATTGGTGGCCAAAATGAAGAAAGA
K L I K E A H N I S H A G R E A V L L K I Q E N Y W W P K M K K A C

5456 TATATCTCTTTCTTCTACATGTAATGTAGTAACTCTTTGAACTTGAACCTTATAGCCCTCAAGCTATTGTACACCCCAACCAACCT
I S S F L S T C N V C K M V N P L N L K P I S P Q A I V H P T K P

5556 TTTGATAAATTTTATATGGATTACATTGGGCCATTGCCACCATCAGAAGGTTATGTGATGTTTATGTTGGTATGCTGCCACTGGATTACTTGGT
F D K F Y M D Y I G P L P P S E G Y V H V L V V V D A A T G F T W L

5656 TGTACCCCACTAAGGCTCAAACTCCAGGCCCAATTAAGCTTCTTAATCATCTCACTGGACTAGCAATTCCAAAGGTGCTGATTCTGATCAAGGATC
Y P T K A Q T S K A T I K V L N H L T G L A I P K V L H S D Q G S

5756 AGCATTTACTTCTGAAGAATTTGCTCAGTGGGCAAGGAAAGGAATATACAATTGGAATTCAGTACTCCTTACCACCTCAAGTAGTGGGAAAGTGGAA
A F T S E E F A Q W A K E R N I Q L E F S T P Y H Q S S G K V E

5856 AGGAAAAACAGTGAAATTAAGAACTTTTAACTAAGCTTTGGTGGAGGCTTTAAAGTGGTATAACCTTATATCCAGTGTGCAACTTGGCTCTAAATA
R K N S E I K K L L T K L L V G R P L K W Y N L I S S V Q L A L N N

5956 ACACTCATGTTGTGACGACCAAGTATACTCTCATCACTAATGTTTGAATTTGATGTAATTTACCATTTGCTAATAAGGATACCTTGGACTGGACAAG
T H V V S T K Y T P H Q L M F G I D C N L P F A N K D T L D W T R

6056 AGAAGAAGAACTTGTCTCTTGCAGGAAATTCGTGAATCTTTACAACACCCCTGTACAACCCCCACCTGCTGCTGGTGGTACCATACGTTGGCCAGCTG
E E E L A L L Q E I R E S L Q H P V Q P P T C S G W S P Y V G Q L

6156 GTCCAGGAGAGGGGTGTACAGGCGGTACAAATTAAGGCTAAGTGGAGGAGCTTCAAAAGGTCTTGGAAATTTGAATCTTAGAACTGTGATTATAGTGG
V Q E R V R P S Q L R K P T A H Q H N G T R T C D D P E G M D

6256 ACCATCTAGGCCAACGGAATCTGTGAGTATTGACAATTTAAACCTACAGCACACCAGCATAATGGAACAAGAATCTGTGATGACCCCTGAAGGAATGGA
H L G Q R K S V S I D N L K P T A H Q H N G T R T C D D P E G M D
Env M E Q E H V M T L K E W M

6356 TGGAAATGGAATGCTCACAACTACAGAACTTCAGTGGACTCATCTGAGTTGCATGTTGACATACCTGAGGATATTCCTTTAGTACCAGAGAAGGT
G M E C S Q T T T E T S V D S S
E W N A H K Q L Q K L Q S V T H S P E L H V D I P E D I P L V P E K V

6456 ACCTTTGAAATGAGGATGCGATATAGATGTTTACTTTGTGCTACTTCTACTAGAATAATGTTTGGATACTATTCTTTCTCTATGTTTTCATAA
P L K M R M R Y R C Y T L C A T S T R I M F W I L F F L L C F S I

6556 GTTACCTTGAGTACAATTATAAGTATTCTTAGATATCAATGGAAGAAGCAATAACACATCTGGCCAGTCTTAAGCTGGCAGGTGACTAATTCACATG
V T L S T I I S I L R Y Q W K E A I T H P G P V L S W Q V T N S H V

6656 TAACCATGGGAGGAAATACTTCTCTCTCCAGAGGAGCGTATACAATACCAAACTTCCCGTAGAGGTTAACATCTCAGGGATCCCAAGG
T M G G N T S S S R R R R D I Q Y H K K L P V E V N I S G I P Q G

6756 TCTTTCTTCGCACTCAACCAAAACCTATATTTCAAAAGAAAGAACTTTAGGTCTTTCTCAAGTGATTCTTATTGACTCTGATACTATTACTCAAGGT
L F F A P Q P K P I F H K E R T L G L S Q V I L I D S D T I T Q G

6856 CATATTAACAACAGAAAGCATATTTAGTCTCAACAATTAATGAAGAGATGGAGCAATTACAAAAGACAGTATTACCTTTTGACTTACCCATCAAGGACC
H I K Q Q K A Y L V S T I N E E M E Q L Q K T V L P F D L P I K D P

6956 CTCTAACTCAAAAGGAATACATAGAAAAAGGTGCTTTCAAAAATATGGACATTTGTTATGTTATAGCTTTAATGGAATAAAGTTTGGCCTTCAAGA
L T Q K E Y I E K R C F Q K Y G H C Y V I A F N G N K V W P S Q D

7056 TTTAATACAAGATCAATGCTCCATTACCTCTCGCTTTGGAAATAAAGTATAGGAACCACTATATGGAAGTATTATATACCATGCTCCATTAA
L I Q D Q C P L P R F G N N L K Y R N H T I W K Y I P L P F K

7156 GTATCTCCAATTTGACAAGAGTAGAATCCTATGGTAATATTAGGATAGGCAGCTTTAAAGTCTGATGAATTTAGACAAAATGCCACACATGGAATAT
V S S N W T R V E S Y G N I R I G S F K V P D E F R Q N A T H G I F

7256 TTTGTTCTGATGCACTATATAGTAATTTGSTATCCAGTGATCTACCTTCTCGGTACAACAATCTTTGCTCAAGCATATATAACAAAGSTACTTATGAA
C S D A L Y S N W Y P R D L P S S V Q Q S F A Q A Y I T K V L M K

7356 AAGGAAAAAGCAACCTACTTTACGAGATATAGCTTTTCAAAAGGAATTGAGCCCTGTAGGCTGTGATGCTATTACAGCTATTAAACCATATGATATC
R K K Q P T L R D I A F P K E L S P V G S G M L F R P I N P Y D I

7456 TGTAATATGCCAAGAGCAGTATTATTATTAATAAACAATATTATACTTTCTCACTATGGGAAGGAGATTGTGGATATTACCAACACAATCTTACTCTTC
C N M P R A V L L L N K T Y Y T F S L W E G D C G Y Y Q H N L T L H

Fig. 2 (Forts.)

ERSATZBLATT (REGEL 26)



7556 ATCCCGCATGTAAGAACTTCAATAGAAGTACAGACCATCCATATGCTTGCAGATTTTGGAGAAACAAGTATGACTCTGAGTCAGTGAATGCTATAA
P A C K N F N R T R Q D H P Y A C R F W R N K Y D S E S V Q C Y N

7656 TAATGATATGTGTATTATAGACCTTTGTATGATGGAAGTGAAGTACTGAGGATGGGGATGGCTGGCATATAGTACTCTTTCCATCCCCCATCTGT
N D M S C Y Y R P L Y D G T E N T E D W G W L A Y T D S F P S P I C

7756 ATTGAAGAAAAAGCAATCTGGAAGAAAAATTATACTCTGTCTGTATAGCAGAATGTGTAAATCAAGCCATGGAATATGGTATAGATGAAGTATTAT
I E E K R I W K K N Y T L S S V L A E C V N Q A M E Y G I D E V L S

7856 CCAAACTAGATCTGATATTGGGAATCTGACTCATCAATCAGCAGATGAGGCTTCATTCCGGTTAATAATTCACTTGGCCTAGATATGAGAAACAAAA
K L D L I F G N L T H Q S A D E A F I P V N N F T W P R Y E K Q N

7956 TAAACAACAAAAAACCCTCTTGTGAAGAAAGAAAGGTAGAAGACAAAGAGTCCGTAAGTACGGAACCAAGAAAGGATACAGAGGCGAGGCTTAGGC
K Q Q K T S C E R K K G R R Q R R S V S T E N L R R I Q E A G L G

8056 CTGGCAATGCAATTACTACTGTGCTAAGATCTGACCTGATGATCAAAAATTAGCCAAAGGAGTACATTTGCTTAGAGATGATGTTGCTACTCTAA
L A N A I T T V A K I S D L N T Q K L A K G V H L L R D H V V T L M

8156 TGGGAAGCAATTTGGATGATATTGTGTCCCTAGGAGAGGAATACAAATAGAATATACATAATCACTTAACCTCTTTGAAATTGCTTACTTTGAAAA
E A N L D D I V S L G E G I Q I E H I H N H L T S L K L L T L E N

8256 TAGAATTGACTGGAGGTTTATAAACGATTTCAGGATTCAAGAAGAATTAGGTGTTTCAGATAATATAATGAAAGTAATAAGGAAAACTGCAAGGTGCATT
R I D W R F I N D S W I Q E E L G V S D N I M K V I R K T A R C I

8356 CCTTACAATGTCAACAACTAGGAATCTAAATCTCCACTGCATGGGAAATATATTATATTATGAGATCATCTTCTACCCTATATATACAGAN
P Y N V K Q T R N L N T S T A W E I Y L Y Y E I I I P T T I Y T Q N

8456 ATTGGAATATAAGAATCTAGGTACCTGTGAAGGATGCAAGATTTTATCTAAGGTGTGGATTCAACAACCTTTGAAGTACTAAACCCAGGAATGTGG
W N L G H L V R N A G A Y L S K V W I Q Q P F E V L N Q E C G

8556 AACAAATATATATTACATATGGAAGATGTGTTGACCAAGACTATATAATATGTGAAGAAGTAATGGAACCTCTCTCTGTGGAATGGAAGTGSTCA
T N I Y L H M E E C V D Q D Y I I C E E V M E L P P C G N G T G S

8656 GACTGCCCAGTGTCAACCAACCACTTACAGATGAATACTTGGAAATTGAACCCCTAAAGAATGGGAGTTATTGTTTATCAAGTACTACAGACTGTG
D C P V L T K P L T D E Y L E I E P L K N G S Y L V L S S T T D C G

8756 GCATACCAGCTTACGTGCTGTGTTATAACGGTGAATGACCAATCAGCTGTTTGTATAAGAGTTTAAAGGCCACTTAAACAGGAATGAAAGTAAAC
I P A V V I T V N D T I S C F D K E F K R P L K Q E L K V T

8856 AAAATATGCACCATCCCTCTCAATTAGAAGTTCCTCGGTTAAACAGCTGATTGCAAAAATAAAGGAATTCAAATAGAAATTACCAGCAGC
K Y A P S V P Q L E L R V P R L T S L I A K I K G I Q I E I T S S

8956 TGGGAACTATAAAGAGCAAGTCGCAAGGGCCAGGAGCTTCTACGCTTGGACCTTCACGAAGGAGACTATCCAGAGTGGCTGCAGCTCCTTGGAG
W E T I K E Q V A R A K A E L L R L D L H E G D Y P E W L Q L L G E

9056 AAGCAACTAAAGACGTTTGGCCTACAATCTCCAACCTCGTTTCTGGAATAGGTAATTTTCATAAAGGACACTGCTGGAGGCCATTTTGGAACTGCCTTTAG
A T K D V W P T I S N F V S G I G N F I K D T A G G G I F G T A F S

9156 TTTTCTGGGATATGTAACCTGTACTTTTGGGATTTGTGATAATTTTGCATAATTTTAAATTATAAAAAATCATAGGATGGCTTCAAAATACCCGGAAG
Bel 1 M A S K Y P E
F L G Y V K P V L L G F V I I F C I I L I I K I I G W L Q N T R K

9256 AAGGACCAATAACTGAGGGGGTTGAAGAAGATTTTAACTCCCATTCCTTCTGTTTGGACCTTACCTCAGGTAATAAAGAAGAACCTTTGATTCTTT
G P I T E G V E E D F N S H S T S G L D L T S G N K E E P L I S L
K D Q

9356 AGCCCTATTCTCTATGCATACCAGTAAATTTGTTGTTGGATAAGGGATCACTTTTGTGAAAAATATTATCCTTTGGAGGGAAGCAAAAGTGTATTAT
A L L S M H T S K I V V W I R D H F F V K I L S F G G K Q K L Y Y

9456 ATATGCAACCAATGTCTATAAAGGAATTCCTGAAAGTGGATACATAACTCTCAATACTAAATATTATCTATATGAGAAAGGACCTACTGAGACTGGCACCA
I C N Q C H K G I P E S G Y I T L N T K Y Y L Y E K G P T E T G T K

9556 AAGGTCTAACTCTTATGAGAAGGCATGTGCAAAATCCCCCTTTCTGTAACAGTTCGGAAGAAATCCGGAACACCAAGACGGATCTTACTGCTCTGC
G L T L M R R H V Q N S P C F L N S R K E S G T P K T P R L A
bel 2 ORF T V G K N P E H P R R I L L V L Q

9656 AACATCTTATAGCCTATGCCAAGCGACTATCAAGAAGCAGGATGTTCCCGGCCCACTCCTTCCAATTCTGAGTCCGTATGTAATGGCTTGGGACAACCC
T S Y S L C R S D Y Q E A G D C S R P T P S N S E S V C N G L G Q P
H L I A Y A E A T I K K Q D V S R G P L L P I L S P Y V M A W D N P

9756 TCAGAACSTGTCACACGCTCTGGTGAATCTGGGGGAATCATGGAAGAAGTATCTTTATCTCTGTTGGAAGGATGTGGGGAGAGGGATTGACTATG
S E R G H T S G E S G G I M E E V S F I S W L E G L W G E G F D Y A
Q N V V T R L V N L G E S W K K Y L L S P G W K D C G E R D L T M

9856 CTAATCAGAGAATTGTTGGTACCAGGAATAGGCCTGGTACAAATCGCGCTACACTTACTAAACCTATGTGTAAATGTGTAATGGGCGATGTATTACAG
N
L T R E L L V P G I G L V Q I A A T L T K T Y V L M C N G R C I T G

9956 GTTCTAGAACCCGACCCAGATTGTGATCCTTTGTTCTGTAAGTTGTTATGCTGGAACCAAAATATACAAGACCCCTAGAGAGTGTAACCTAGAAGAATGGTG
S R T D P D C D P L F C K L L C W K Q N I Q D P R E C N L E E W C

10056 CCTGTATAGTCTTGTATCCTGAACATGATCCCCCTTTGGGATCCAAAAATGATTGTGCGTAGACATAGGAATCTTTACCTTATTGTATGAGACCCCTTCTC
L Y S L D P E H D P L W D P K M I V R R H R N L L P Y C M R P F L

10156 ATTGGATGAATTATATTCTCACAACTCTTACACAGCAATGTATTATGATGAAAACCTTTGAATATGCTTTGGAGAGCACAGCTGATGATCCAAGTG
I W M N Y I S H N P L T Q C I M M K T L N M L W R A Q A D D P S D

10256 ATGTTGCTTCCCTGTATCCAGAGTCAAAGTTTTTAAGGCATCTCATTTTGACATATTGGAAGTGCCTCTGGGAACAGTGAGGAGGGTGTCTAGGGC
V A S L Y P R V K V F K A S H F D I F G S A S G N S E E R V S W A
PPT U3

10356 CAAAGAGAATTCTCAGAGGAGAATACTCTGCTGCCATCTAGTGACGATGAGGAAGAAGAAATGTCAGAAAGAGAGGAATTATTGTGCCATATAAAT
K E N S H R G E Y S L L P S S D D E E E E M S E R E E L L C H I N

Fig. 2 (Forts.)

ERSATZBLATT (REGEL 26)



10456 CAGTGTCAACAAAAGCTCTTTTATCCCGGAGGGACGACTGATGTCCTTGGAAATGGAAAGCAATGTTTGGCTCACTAAATTTGTTAATATTAAATTTCTTA
Q C Q Q K L F Y P G G T T D V L G M E S N V W L T K F V N I K F P K

10556 AAGGAACAAAAGTGATACTTCCTGATGGAAGAAAATTCATAGCCTGTGATCCTGAGCTAAAACCATTTGTCAGGAATTGAAATTCCTGGATAGGGCAAC
G T K V I L P D G R K F I A C D P E L K P L L Q E L K F L D R A T

10656 ATCTGAGTCATCTGACTCTGAATAGAAAAGCCTGAATTTACCTGGATTATGCAACTTTGTCCGAGGTGGCAGACTGGTTATGTATCTGTCATACTCGGGGA
S E S S E S E

10756 AAGTTTGTCTTTACATGTTCAAGACATATAAAGGGTGGAAAAATATATTCTCTGACTAAACTTCCTGGGGACTAGAGGTGTGGAAACTTTGCTGCCTCTG
CTTCACGGGAAGTTTTTGGTTCGAATCCTTTTTTAGGTACTTAGTTAAGATAAGTAGTAATAAATTACTCTCGTTCATGTATTCATATCGAAACTATGT

10856 ATCCTTTAAAACCATGTATTCTTTAGTCATCTAGATACTTAGAGTATGAAAAAGAAACTGCAATAGTAACATCAATGTTAGTAAATAAAGTACAGCTT

10956 AGTCATCTGATGATGTCACGAGAAAAGAACCTAGAAGAGAAGAACACTTTCCGGCATGCAACAGAGCGGGAGCTTGCTGTAGGAGCTAAGTCACCGTCTT

11056 ACATCTAGAGCCTACTCTTCTTGAACGTTCGAATCCTATTTTTTGGAACTCTTACATCACCTTTAAGAGACTGAAAAGCATGACTCGTGCACAGGAAGCT

11156 CCTTTAGGGTAGAGGAAATGTTCTAATCTCCTATCTTAAAGGGTGTCTTCATTTAAGGTTTCGAAACTGTGTACTGGAAGTAGATTTTGCATAACTTTAAA
R

11256 CTTTTAGTTGCATGTTTCTGCTATTAGCAGCATATAAAGGGTTATGGTAGATTGTACGGGAGCTCTTCTCACAGACTTGGCTGCGTCCAGGGTGAGATT
U5

11356 GAGACTCTCCAGCTTGGGTAAGATTTTGATATGTATTTTGCCTTGAATATTATTGCTTGTCTCAAAAATTAATAAATTTGGCTTTTCTTTCACTCAATTGA

11456 AGCTTCATATAATTATATTATTGTCTGAAGCCAGAACTCACATGAGTGGTGTCTCTATTTCTTGGGGAAAAGTGTCTTCTATTTGAAAGTGTTAGAGC

11556 TACTAAGTGAAGAACTAATCTATCCCAGGTATAGGCCACGACA

11656

Fig. 2 (Forts.)



6/6

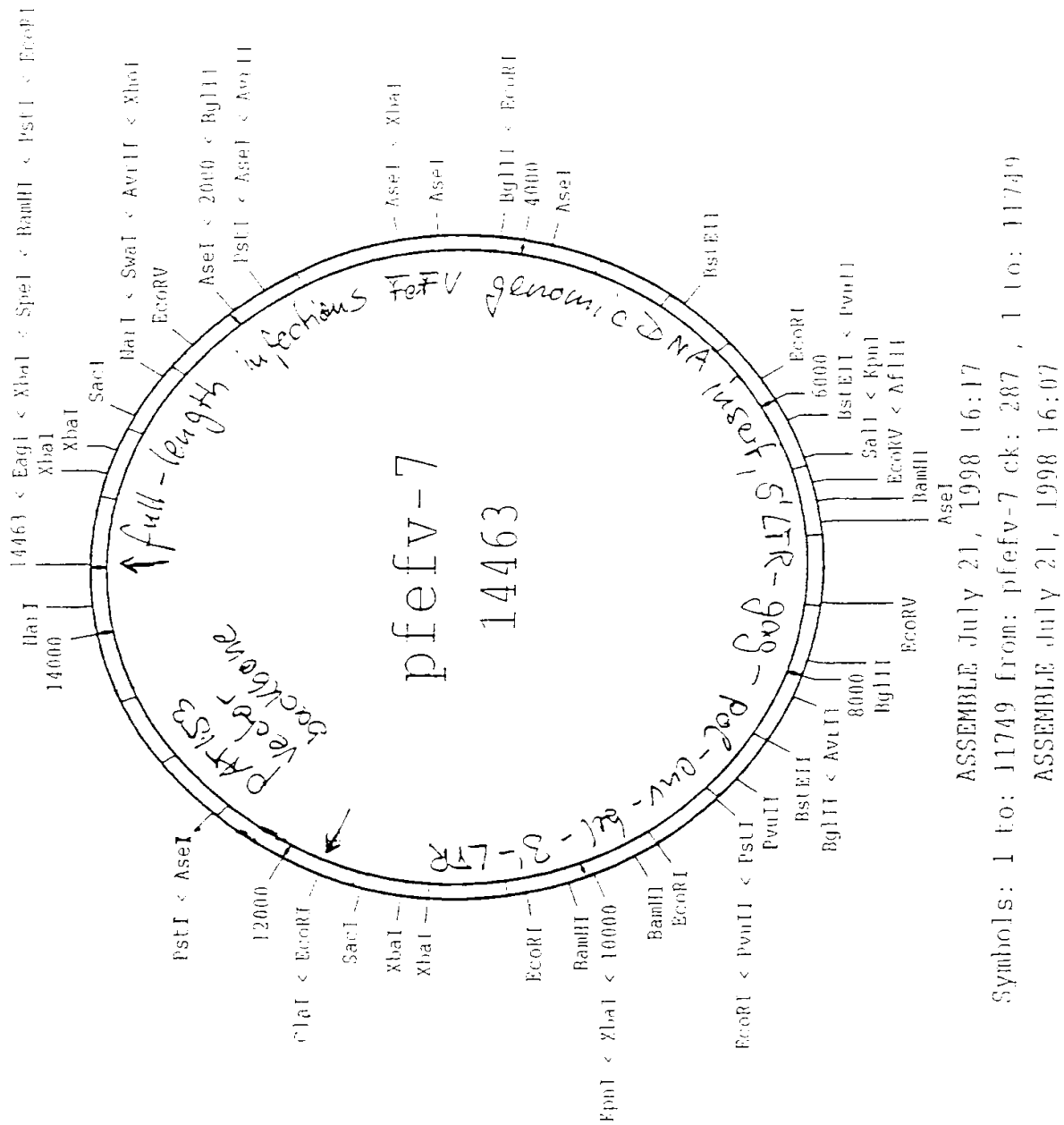


Fig. 3

PLASMIDMAP of: pfev-7 check: 8108 from: 1 to: 14463

vis073 April 20, 2000 10:44



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 99/04052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/867 C12N5/10 A01K67/027 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HELPS CR UND HARBOUR DA: "Comparison of the complete sequence of feline spumavirus with those of the primate spumaviruses reveals a shorter gag gene" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 78, no. 10, October 1997 (1997-10), pages 2549-2564, XP002135716 READING GB page 2549, right-hand column, last paragraph --- -/--	1-6,9-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 2000

Date of mailing of the international search report

09/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 99/04052

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WINKLER I ET AL: "Characterization of the genome of feline foamy virus and its proteins shows distinct features different from those of primate spumaviruses" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 9, September 1997 (1997-09), pages 6727-6741, XP002135717 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US cited in the application page 6728, right-hand column, paragraph 2 -page 6729 ---	1-6,9-12
A	SCHMIDT M ET AL: "REPLICATING FOAMY VIRUS-BASED VECTORS DIRECTING HIGH LEVEL EXPRESSION OF FOREIGN GENES" VIROLOGY.US, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, vol. 210, 20 June 1995 (1995-06-20), pages 167-178, XP000674745 ISSN: 0042-6822 the whole document ---	1-6,9-16
A	DE 43 18 387 A (BAYER AG) 8 December 1994 (1994-12-08) the whole document ---	1-6,9-16
A	WO 98 35024 A (SWITZER WILLIAM M ; HENEINE WALID (US); US HEALTH (US); BROWN JENNI) 13 August 1998 (1998-08-13) page 6, line 21 - line 35 -----	1-6,9-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/04052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4318387 A	08-12-1994	EP 0632129 A JP 6343477 A US 5646032 A	04-01-1995 20-12-1994 08-07-1997
WO 9835024 A	13-08-1998	US 5882912 A AU 6156298 A	16-03-1999 26-08-1998



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/04052

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/867 C12N5/10 A01K67/027 A61K48/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HELPS CR UND HARBOUR DA: "Comparison of the complete sequence of feline spumavirus with those of the primate spumaviruses reveals a shorter gag gene" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, Bd. 78, Nr. 10, Oktober 1997 (1997-10), Seiten 2549-2564, XP002135716 READING GB Seite 2549, rechte Spalte, letzter Absatz --- -/--	1-6,9-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen (im Recherchenbericht genannten) Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cupido, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WINKLER I ET AL: "Characterization of the genome of feline foamy virus and its proteins shows distinct features different from those of primate spumaviruses" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 71, Nr. 9, September 1997 (1997-09), Seiten 6727-6741, XP002135717 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US in der Anmeldung erwähnt Seite 6728, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 6729 ---	1-6.9-12
A	SCHMIDT M ET AL: "REPLICATING FOAMY VIRUS-BASED VECTORS DIRECTING HIGH LEVEL EXPRESSION OF FOREIGN GENES" VIROLOGY,US,RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, Bd. 210, 20. Juni 1995 (1995-06-20), Seiten 167-178, XP000674745 ISSN: 0042-6822 das ganze Dokument ---	1-6,9-16
A	DE 43 18 387 A (BAYER AG) 8. Dezember 1994 (1994-12-08) das ganze Dokument ---	1-6,9-16
A	WO 98 35024 A (SWITZER WILLIAM M ;HENEINE WALID (US); US HEALTH (US); BROWN JENNI) 13. August 1998 (1998-08-13) Seite 6, Zeile 21 - Zeile 35 -----	1-6,9-16

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/04052

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4318387 A	08-12-1994	EP 0632129 A	04-01-1995
		JP 6343477 A	20-12-1994
		US 5646032 A	08-07-1997
WO 9835024 A	13-08-1998	US 5882912 A	16-03-1999
		AU 6156298 A	26-08-1998

